

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|  |  |   |
|--|--|---|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b><br><b>A61K 39/39, 39/145, 39/155, A61P 37/04, 31/12</b>   | <b>A2</b>  | <b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 00/15256</b><br><b>(43) Date de publication internationale:</b> 23 mars 2000 (23.03.00) |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/02177<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 13 septembre 1999 (13.09.99)<br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>98/11520 11 septembre 1998 (11.09.98) FR<br><b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).<br><b>(72) Inventeur; et</b><br><b>(75) Inventeur/Déposant (US seulement):</b> HAENSLER, Jean [FR/FR]; 17, rue J. Piccandet, F-69290 Saint Genis les Ollières (FR).<br><b>(74) Mandataire:</b> KERNEIS, Danièle; Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins, Direction de la Propriété Industrielle, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).  | <b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br><b>Publiée</b><br><i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i> |   |
| <b>(54) Title:</b> IMMUNOSTIMULANT EMULSION<br><b>(54) Titre:</b> EMULSION IMMUNOSTIMULANTE<br><b>(57) Abstract</b><br><p>The invention concerns an oil-in-water immunostimulant emulsion comprising an aqueous phase and an oil phase, characterised in that it further comprises an immunostimulant polynucleotide whereof at least part is covalently bound to at least a lipid molecule. The invention also concerns a vaccine composition comprising such an emulsion as immunoadjuvant.</p> <b>(57) Abrégé</b><br><p>La présente invention concerne une émulsion immunostimulante de type huile dans eau, qui comprend une phase aqueuse et une phase huileuse, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un polynucléotide immunostimulant dont au moins une partie est complée de façon covalente à au moins une molécule lipidique. L'invention concerne également une composition vaccinale comprenant à titre d'immunoadjuvant, une telle émulsion.</p> |  |   |

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France  | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana   | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkmenistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Brazil                    | IL | Israël  | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon   | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya   | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakhstan                                    | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |   |    |  |    |                       |

## EMULSION IMMUNOSTIMULANTE

L'invention concerne le domaine des vaccins et plus particulièrement les  
5 adjuvants de vaccins.

Les vaccins, qu'ils soient prophylactiques ou thérapeutiques, sont destinés à stimuler le système immunitaire de l'organisme humain ou animal auquel ils sont administrés, la réponse du système immunitaire pouvant être soit une réponse de type humorale (production d'anticorps), soit une réponse  
10 de type cellulaire, soit encore une combinaison des 2 types de réponses. De façon classique, depuis de nombreuses années, la vaccination a consisté à administrer à un organisme une version non pathogène d'un micro-organisme de façon à préparer le système immunitaire à réagir efficacement dans le cas où l'organisme serait amené ultérieurement à rencontrer le même micro-  
15 organisme, dans sa version pathogène. L'antigène administré lors de la vaccination peut être de différentes natures : micro-organisme tué entier ou fragmenté, souche vivante atténuée du micro-organisme, fractions antigéniques du micro-organisme ou encore polynucléotides susceptibles de conduire à l'expression par l'organisme d'une fraction antigénique.

20 Depuis déjà longtemps, on a cherché à augmenter la réponse du système immunitaire ou à modifier sa nature, non pas simplement en agissant sur l'antigène administré ou sur son mode d'administration, mais également en lui adjoignant des substances immunostimulatrices ou adjuvants. Depuis l'adjuvant complet de Freund, de nombreux produits ont été testés, notamment  
25 des sels minéraux (tels que le chlorure de zinc, le phosphate de calcium, l'hydroxyde d'aluminium ou encore le phosphate d'aluminium par exemple), des saponines, des polymères, des lipides ou des fractions lipidiques (Lipide A, Monophosphoryl Lipid A),...etc. Cependant, peu d'entre eux présentent toutes les caractéristiques souhaitées : être de bons immuno-adjuvants, stables, mais  
30 sans risque de toxicité.

On connaît d'autre part, par la demande WO 96/02555, des oligonucléotides pouvant avoir une activité immunostimulatrice, ces oligonucléotides pouvant être administrés comme adjuvant vaccinal. Cette

référence mentionne également la possibilité d'associer à ces oligonucléotides par liaison ionique, covalente ou par encapsulation, des moyens pour cibler l'administration de l'oligonucléotide. De tels moyens peuvent être notamment constitués de stérol, de lipide (par exemple un lipide cationique, un virosome ou un liposome) ou un agent de liaison spécifique à la cellule-cible (par exemple un liant reconnu par un récepteur spécifique de la cellule-cible). Cette demande mentionne encore, parmi toutes les variantes d'utilisation des polynucléotides décrits, la possibilité de les administrer en conjonction avec un véhicule porteur pharmaceutiquement acceptable. Cette demande n'identifie pas de véhicule comme étant d'un intérêt particulier mais en donne une liste indicative et cite à cet égard notamment les solutions, les solvants, les milieux de dispersion, les agents-retard, les émulsions et autres; l'utilisation de tels milieux pour des substances pharmaceutiquement actives étant mentionnée comme étant bien connue dans ce domaine.

Selon l'enseignement de ce document, la quantité d'oligonucléotides administrée doit être en quantité suffisante pour réaliser l'effet biologique recherché.

Or, les auteurs de la présente invention ont trouvé que, de façon tout à fait inattendue, il était possible d'accroître fortement l'effet immunoadjuvant d'un oligonucléotide, sans être obligé d'accroître la quantité d'oligonucléotides ou la quantité d'antigènes administrée.

Pour atteindre ce but, l'invention a pour objet une émulsion immunostimulante du type huile dans eau, comprenant au moins une phase aqueuse et une phase huileuse, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un polynucléotide immunostimulant dont au moins une partie est couplée de façon covalente à au moins une molécule lipidique.

Aux fins de l'invention, on entend par émulsion de type huile dans eau, une dispersions de gouttelettes d'huile dans une phase aqueuse pouvant être constituée par du tampon tel que le tampon PBS. La phase huileuse est constituée par une huile pharmaceutiquement acceptable, qui peut être une huile minérale, animale ou végétale. De préférence, on utilise une huile métabolisable telle que le squalène, les esters (notamment l'oléate d'éthyle, le

myristate d'isopropyle), une huile végétale( par exemple l'huile de ricin, l'huile de tournesol, l'huile d'olive...)ou encore une huile végétale modifiée (ex : les macrogol glycerides). On peut, notamment, obtenir une émulsion satisfaisante en mélangeant 500 mg de squalène à 10 ml de tampon PBS dans un appareil  
5 tel qu'un ULTRA-TURRAX™, puis en microfluidisant la dispersion obtenue grâce à un microfluidiseur tel que le Microfluidics™, ce qui permet d'obtenir des particules huileuses dont le diamètre est inférieur à 200 nm.

Afin de faciliter la formation de l'émulsion, il est possible d'utiliser en outre un agent tensio-actif , notamment un agent tensio-actif dont la valeur HLB  
10 (Balance Hydrophile/Lipophile) est comprise entre 6 et 14. Il est notamment possible d'utiliser un agent tensio-actif choisi parmi la liste des produits suivants : les esters de sorbitan et les polysorbates, l'huile de ricin éthoxylée hydrogénée ou non, l'acide stéarique éthoxylé, l'alcool oléique 10 OE, l'alcool cétostéarylique 20 OE, le stéarate de glycérol, le stéarate de propylène glycol,  
15 les lécithines, le lauryl sulfate de sodium, le stéarate de sodium, le cocoate de glycérol éthoxylé, 70E , les esters de glycérol éthoxylés, les acides oléiques éthoxylés, l'oléate de mannitan. On a obtenu de particulièrement bons résultats en utilisant du TWEEN™ 80.

L'émulsion obtenue est considérée immunostimulante si elle est capable de  
20 provoquer ou d'accroître la stimulation du système immunitaire, par exemple lors de son administration conjointement à un antigène vaccinal. Dans cette application, l'émulsion est utilisée comme immuno-adjuvant.

Cette activité immuno-adjuvante peut s'exprimer de différentes façons :

- rendre visible la réponse du système immunitaire à l'administration conjointe  
25 de l'antigène et de l'émulsion, alors que la réponse à l'administration de l'antigène seul ne l'était pas,
- accroître le degré de la réponse du système immunitaire sans en modifier la nature (par exemple : augmenter la quantité d'anticorps produits),
- modifier la nature de la réponse du système immunitaire à l'administration de  
30 l'antigène (par exemple, induire une réponse cellulaire alors que l'administration de l'antigène seul provoquait uniquement une réponse humorale),

- induire ou accroître la production de cytokines, ou de certaines cytokines en particulier.

Par "polynucléotide" au sens de la présente invention, on comprend un  
5 oligonucléotide simple brin ayant de 6 à 100 nucléotides, de préférence de 6 à 30 nucléotides. Il peut s'agir d'oligoribonucléotide, ou d'oligodesoxyribonucléotide. On utilise de préférence des polynucléotides comprenant des séquences de base à symétrie inversée, tel que cela est le cas dans les séquences palindromiques (c'est-à-dire des séquences de type  
10 ABCDEE'D'C'B'A' où A et A', B et B', C et C', D et D' E et E' sont des bases complémentaires au sens de Watson et Crick), et plus particulièrement des polynucléotides comprenant au moins une séquence dinucléotidique Cytosine, Guanine, dans laquelle la Cytosine et la Guanine ne sont pas méthylées. Tout autre polynucléotide connu pour être, par sa nature même, immunostimulant,  
15 peut convenir aux fins de l'invention. Ainsi, il est possible également d'utiliser les oligonucléotides immunostimulants décrits dans la demande de brevet WO96/02555. On a obtenu de particulièrement bons résultats en utilisant un polynucléotide dont la séquence des bases est la suivante :  
GAGAACGCTCGACCTTCGAT.

20 Les oligonucléotides convenant aux fins de l'invention peuvent se présenter sous forme de phosphodiester, ou afin d'être plus stables sous forme de phosphorothioates ou d'hybrides phosphodiester/phosphorothioates. Bien qu'il soit possible d'utiliser des oligonucléotides provenant de sources d'acides nucléiques existantes tel que l'ADN génomique ou le cADN, on préfère utiliser  
25 des oligonucléotides de synthèse. Ainsi, il est possible d'élaborer des oligonucléotides sur support solide en utilisant la méthode  $\beta$ -cyano éthyl phosphoramidite (Beaucage, S.L. and Caruthers, M.H. Tetrahedron Letters 22, 1859 - 1862 (1981)) pour l'assemblage 3'-5', puis on procède à une précipitation en éthanol en présence d'acétate de sodium 0,3 M non ajusté en  
30 pH (0,3M en final). On effectue ensuite une précipitation par 4 volumes d'éthanol à 80% suivi d'un séchage avant de procéder à une reprise par de l'eau pure.

Les oligonucléotides phosphorothioatés ont un des atomes d'Oxygène composant le groupement Phosphate qui est remplacé par un atome de Soufre. Leur synthèse peut être effectuée comme précédemment décrit, sauf à remplacer la solution iode/eau/pyridine tétrahydrofurane qui est utilisée lors de l'étape d'oxydation nécessaire à la synthèse des liaisons phosphodiester par une solution TETD (tétraethylthiuram disulfide) apportant les ions sulfates permettant de produire le groupement phosphorothioate.

On peut également envisager d'autres modifications des liaisons phosphodiesters, des bases ou des sucres, pour modifier les propriétés des oligonucléotides utilisés, et notamment pour accroître leur stabilité.

Selon l'invention, on couple au polynucléotide au moins une molécule lipidique de façon covalente. Cette molécule lipidique est de préférence une molécule de cholestérol ou de dérivé de cholestérol. Le couplage peut être effectué par liaison covalente à une ou à chaque extrémité du polynucléotide, ou encore par insertion à côté de chaque base d'au moins une molécule lipidique. Ce couplage peut être effectué directement lors de la synthèse du polynucléotide en utilisant dans le synthétiseur d'oligonucléotides un réactif de type Cholestérol Phosphoramidite au lieu du réactif Phosphoramidite habituellement utilisé.

Les antigènes dont il est possible de potentialiser l'effet grâce à l'émulsion selon la présente invention, peuvent être de nature variée ; il peut notamment s'agir de protéines, de glycoprotéines, de glycoconjugués, de polysides ou encore de polynucléotides comprenant des fractions d'ADN susceptibles de conduire à l'expression de molécules d'intérêt ; il peut également s'agir d'un mélange de différents antigènes. De particulièrement bons résultats ont été obtenus avec une composition comprenant des antigènes de la grippe tels qu'ils sont présents dans le vaccin commercial VAXIGRIP™.

On peut obtenir une émulsion selon l'invention en procédant de la façon suivante : on mélange tout d'abord, sous agitation, l'huile avec la phase aqueuse constituée éventuellement par une solution tampon dans laquelle a été incorporé un surfactant. Le mélange obtenu est homogénéisé au moyen, par exemple, d'un agitateur à hélice, afin de conduire à une émulsion du type

huile dans eau. De préférence, on traite ensuite l'émulsion obtenue au moyen d'un microfluidiseur afin de réduire les gouttelettes d'huile à un diamètre inférieur à 200 nm.

Puis, cette émulsion étant maintenue sous agitation, on lui ajoute  
5 simplement le polynucléotide auquel a été couplé le lipide, et on obtient l'émulsion objet de la présente invention.

Lorsque cette émulsion est destinée à être utilisée comme immuno-  
adjuvant, on la mélange sous agitation, à une composition comprenant  
l'antigène dont on souhaite potentialiser l'effet. Le mélange peut être  
10 à avantageusement effectué dans un rapport volumique de 1. On peut, ensuite, vérifier l'effet inattendu et notamment l'effet synergique obtenu sur la stimulation du système immunitaire par l'utilisation simultanée d'un polynucléotide couplé à au moins une molécule de lipide, et son incorporation à une émulsion de type huile dans eau.

15 A cette fin, il est possible de réaliser un test d'immunogénicité sur des souris divisées en plusieurs groupes, à qui on administre, suivant le groupe :

- soit une composition comprenant uniquement l'antigène ou le mélange d'antigènes vis-à-vis desquels on veut tester l'effet immunostimulant de l'émulsion selon l'invention,
- 20 - soit une composition, comprenant l'antigène ou les antigènes d'intérêt à laquelle a été ajoutée une solution comprenant uniquement des polynucléotides couplés à au moins une molécule de lipides,
- soit une composition comprenant l'antigène ou les antigènes d'intérêt à laquelle a été ajoutée une émulsion de type huile dans eau, sans  
25 polynucléotide, ou avec un polynucleotide dépourvu d'activité immunostimulante vis-à-vis des antigènes administrés,
- soit une composition comprenant l'antigène ou les antigènes d'intérêt à laquelle a été ajoutée une émulsion selon l'invention.

30 Pour chacune des souris immunisées, on peut, ensuite, déterminer la quantité et la nature des anticorps produits ce qui permet de déterminer la GMT (ou Moyenne Géométrique du Titre en Anticorps) ; on peut également effectuer des dosages des cytokines produites ; en outre, on peut effectuer des



dosages permettant de déterminer la réponse cellulaire du système immunitaire.

Les résultats obtenus ont montré un effet synergique important des éléments constituant l'émulsion selon l'invention.

- 5 De plus, l'émulsion obtenue selon l'invention présente une stabilité accrue par rapport aux émulsions de même nature, i.e. celles constituées d'une phase aqueuse et d'une phase huileuse identiques, mais dépourvues de polynucléotides.

- 10 Les exemples qui suivent illustrent de façon plus précise un mode de réalisation de l'invention.

#### Exemple 1

- 15 On prépare des oligonucléotides grâce à un automate synthétiseur fourni par Applied Biosystems qui met en œuvre la méthode chimique standard au phosphoramidite et qui comporte à chaque cycle une étape d'oxydation.

- Cette étape d'oxydation est réalisée au moyen d'une solution iode/eau/tétrahydrofurane/acétonitrile pour obtenir une liaison phosphodiester et au moyen d'une solution tétraéthylthiuram/acétonitrile pour obtenir une  
20 liaison phosphorothioate. On prépare ainsi un oligonucléotide 3 Db(S) dont la séquence est reproduite sous SEQ ID NO 1 et qui comporte des liaisons phosphorothioate sur toute sa longueur.

- On prépare également un oligonucléotide MGC (S) dont la séquence est reproduite à SEQ ID NO 2, qui comporte à la fois des liaisons phosphodiester  
25 et des liaisons phosphorothioate. Les liaisons phosphorothioate sont situées à chaque extrémité ; il y a 2 liaisons phosphorothioate en 3' et 5 liaisons phosphorothioate en 5'. Cet oligonucléotide ne possède pas de séquence palindromique, et notamment pas de séquence CG.

#### Exemple 2

On prépare des oligonucléotides auxquels sont couplés aux extrémités des molécules de cholestérol. La synthèse de ces oligonucléotides 3 Db(S)-chol et

MGC(S)-chol est effectuée de la même manière qu'à l'exemple 1, à l'exception du réactif Phosphoramidite qui est remplacé par un réactif spécifique, le Cholestérol-ON™ Phosphoramidite fourni par la société CLONTECH Lab. Inc, (USA), lors du premier et du dernier cycle de synthèse afin d'obtenir une

5 molécule de cholestérol insérée avant chacun des nucléotides d'extrémité.

Les séquences de nucléotides obtenues sont identiques à celles des oligonucléotides décrits à l'exemple précédent.

### Exemple 3

10

On dispose de 10 ml de tampon PBS auxquels on ajoute 25 mg de Tween™80 et 500 mg de squalène. Le mélange obtenu est émulsionné grâce à un appareil ULTRA-TURRAX™ T25 pendant 1 min à 13500 tours/min.

L'émulsion obtenue est ensuite fluidisée grâce à un traitement de 5 cycles à

15 500 Psi dans un microfluidiseur Microfluidics™.

### Exemple 4

Préparation d'une émulsion squalène/PBS comprenant des polynucléotides

20 couplés à du cholestérol.

On prépare une émulsion immunostimulante selon l'invention en mélangeant 435 µl de la solution à 2,3 g/l de 3Db(S) couplé au cholestérol obtenue à l'exemple 2 (soit 1 mg d'oligonucléotide), avec 2 ml de l'émulsion squalène/PBS obtenue à l'exemple 3, maintenue sous agitation.

25 On prépare une autre émulsion en mélangeant 263 µl de la solution à 3,81 g/l de MGC(S) couplé à du cholestérol obtenue à l'exemple 2 (soit 1 mg d'oligonucléotide) avec 2 ml de l'émulsion squalène/PBS obtenue à l'exemple 3, maintenue sous agitation.

### Exemple 5

Préparation des compositions d'immunisation.

- On prépare des doses d'immunisation de différentes natures en ajoutant sous agitation 2 ml de vaccin splitté contre la grippe NIB16 (monovalent A/Singapore H1N1) contenant 100 µg d'hémagglutinine HA en tampon PBS à 2 ml de chacune des préparations suivantes :

- tampon PBS
- 10 - solution MGC(S) obtenue à l'exemple 1,
- solution MGC(S)-chol obtenue à l'exemple 2,
- émulsion MGC(S)-chol obtenue à l'exemple 4,
- solution 3Db(S) obtenue à l'exemple 1,
- solution 3Db(S)-chol obtenue à l'exemple 2,
- 15 - émulsion 3Db(S)-chol obtenue à l'exemple 4.

### Exemple 6

Immunisation.

- 20 On dispose de groupes de 6 souris Balb/c femelles âgées de 6 à 8 semaines, chaque groupe correspondant à une des préparations effectuées à l'exemple 6. Chacune des souris est immunisée avec 200µl de la préparation correspondant à son groupe et reçoit donc 5µg de HA par immunisation, chaque souris étant immunisée 2 fois à 3 semaines d'intervalle, avec la même préparation.
- 25 2 semaines après la deuxième injection, on mesure la réponse en anticorps spécifiques anti-HA, grâce à un test ELISA, et on détermine la GMT pour les IgG1 ainsi que pour les IgG2a.

Les résultats obtenus sont indiqués ci-après :

|                            | GMT/IgG1 | GMT/IgG2a |
|----------------------------|----------|-----------|
| HA uniquement              | 38 062   | 2 137     |
| 5 HA/MGC(S)                | 37 518   | 1 050     |
| HA/MGC(S)-chol             | 28 039   | 1 498     |
| HA/MGC(S)-chol/émulsion    | 264 776  | 26 981    |
| HA/3Db(S)                  | 63 939   | 43 529    |
| HA/3Db(S)-chol             | 65 904   | 31 066    |
| 10 HA/3Db(S)-chol/émulsion | 611 301  | 218 142   |

Les résultats obtenus confirment que l'oligonucléotide 3Db(S) est bien doté de propriétés immunostimulantes car il est capable d'induire un accroissement de la réponse en anticorps par rapport à ce qui est obtenu lors de l'administration des antigènes seuls. Par contre, les résultats obtenus avec l'oligonucléotide MGC(S) ne démontrent pas d'activité immunostimulante .

D'autre part, on remarque que, de façon inattendue, l'émulsion contenant un polynucléotide immunostimulant tel que le polynucléotide 3Db(S) conduit à une production d'anticorps nettement supérieure à celle obtenue avec une émulsion contenant le polynucléotide MGC(S)-chol; cet effet est encore plus remarquable en ce qui concerne la production d'IgG2a; ce qui est indicateur d'une orientation de la réponse immunitaire vers un type TH1, orientation parfois souhaitée dans certaines cibles vaccinales.

En effet, en considérant que l'effet attendu d'une émulsion est l'effet obtenu avec l'émulsion HA/MGC(S)-chol, ( l'oligonucléotide MGC(S) n'ayant par lui-même aucun effet immunostimulant vis-à-vis des antigènes administrés ainsi que cela est analysé ci-dessus), on note un effet synergique important de l'émulsion selon l'invention car le titre obtenu pour la production d'anticorps, que ce soit pour les IgG1 ou de façon plus nette encore pour les IgG2a, est nettement supérieur à la somme des titres obtenus séparément pour chacune des 2 compositions (émulsion HA/MGC(S) d'une part et solution HA/3Db(S) d'autre part)

Exemple 7.

On prépare des compositions vaccinales comprenant les éléments suivants:

- antigènes sous-unitaires contre le RSV (ou Virus Syncytial Respiratoire) en présence de gel d'aluminium, à raison de 1 µgramme de protéines totales (Protéines F, G et M)

en tampon PBS ou additionné suivant le cas des éléments suivants:

- solution 3Db(S) obtenue à l'exemple 1,
- émulsion 3 Db(S) obtenue à l'exemple 4,
- 10 - émulsion MGC(S) obtenue à l'exemple 4.

Les doses sont de 50µl/litres et comprennent 50 microgrammes d'oligonucléotides.

- Ces compositions sont administrées à des souris à J0 et à J28; 5 à 6 semaines après l'injection de rappel, on prélève les rates des souris afin d'évaluer la quantité d'interféron  $\gamma$  produite.

On obtient les résultats suivants, après dosage ELISA effectué après restimulation secondaire in vitro:

|  | Quantité d' Interféron en pg/ml |
|--|---------------------------------|
| Antigènes + Adjuvant aluminium                                 | 3432                            |
|  | 2565                            |
|  | 2998                            |
| Antigènes + Adjuvant aluminium<br>+ 3 Db(S)                    | 13400                           |
|  | 9543                            |
|  | 1147                            |
| Antigènes + Adjuvant aluminium<br>+ émulsion MGC(S)            | 5130                            |
|  | 9216                            |
|  | 7173                            |
| Antigènes + Adjuvant aluminium<br>+ émulsion selon l'invention | 57394                           |
|  | 42285                           |
|  | 49839                           |

Ces résultats montrent clairement la synergie obtenue en utilisant un oligonucléotide immunostimulant et une émulsion selon l'invention, lorsqu'on s'intéresse au RSV et qu'on observe la production d'interféron  $\gamma$  qui est un bon  
5    indicateur de la réponse TH1.

Exemple 8:

On prépare des doses d'immunisation identiques à celles de l'exemple 7, à  
10    l'exception des antigènes RSV qui ne sont pas en présence de gel d'aluminium. Les doses de 50  $\mu$ l/litres sont administrées en intramusculaire à des groupes de 6 souris.

4 semaines après l'immunisation, les souris sont saignées et les taux d'anticorps anti-protéines F sont déterminés par titrage ELISA. Les résultats  
15    obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant :

|  | Ig G   | Ig G1 | Ig G 2a |
|--|--------|-------|---------|
| Antigènes + PBS                              | 100    | 100   | 100     |
|  | 100    | 100   | 100     |
|  | 100    | 100   | 100     |
|  | 100    | 100   | 100     |
|  | 100    | 100   | 100     |
| Antigènes +<br>3Db(S)                        | 6400   | 400   | 6400    |
|  | 6400   | 400   | 12800   |
|  | 12800  | 800   | 6400    |
|  | 6400   | 400   | 3200    |
|  | 3200   | 100   | 25600   |
|  | 6400   | 400   | 25600   |
| Antigènes +<br>émulsion MGC(S)               | 12800  | 1600  | 6400    |
|  | 6400   | 400   | 100     |
|  | 51200  | 6400  | 100     |
|  | 25600  | 1600  | 100     |
|  | 25600  | 1600  | 100     |
| Antigènes +<br>émulsion selon<br>l'invention | 25600  | 1600  | 25600   |
|  | 12800  | 400   | 12800   |
|  | 51200  | 1600  | 25600   |
|  | 102400 | 6400  | 1600    |
|  | 51200  | 3200  | 25600   |

Ces résultats confirment l'intérêt d'utiliser une émulsion selon l'invention dans le cas où les antigènes sont les antigènes du Virus Syncytial Respiratoire.

## REVENDECATIONS

5 1. Emulsion immunostimulante du type huile dans eau, comprenant au moins une phase aqueuse et une phase huileuse, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un polynucléotide immunostimulant dont au moins une partie est couplée de façon covalente à au moins une molécule lipidique.

10 2. Emulsion selon la revendication 1, caractérisée en ce que la molécule lipidique est une molécule de cholestérol.

15 3. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polynucléotide immunostimulant comprend au moins une séquence palindromique.

20 4. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polynucléotide immunostimulant est un oligodesoxynucléotide phosphodiester, phosphorothioate ou un hybride phosphodiester phosphorothioate.

5. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polynucléotide immunostimulant comprend une séquence GAGAACGCTCGACCTTCGAT.

25 6. Emulsion selon une des revendications précédentes caractérisée en ce que la partie couplée à au moins une molécule lipidique est située à l'extrémité 5' du polynucléotide.

30 7. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la molécule lipidique est une molécule de cholestérol.

8. Emulsion selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, au moins un surfactant.

35 9. Emulsion selon la revendication 8, caractérisée en ce que le surfactant est du Tween 80.



10. Emulsion selon une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la phase huileuse comprend du squalène

5 11. Composition vaccinale comprenant au moins un antigène vaccinal, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une émulsion immunostimulante selon une des revendications 1 à 10.

12. Composition vaccinale selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène vaccinal contre la grippe.

10

13. Composition vaccinale selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène vaccinal du Virus Syncytial Respiratoire.

15

14. Utilisation d'une émulsion selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un médicament destiné à stimuler le système immunitaire.

20

15. Utilisation d'une émulsion selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un médicament destiné à produire une réponse de type TH1.

16. Utilisation d'une émulsion selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la sécrétion d'interféron  $\gamma$ .

1  
LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Pasteur Merieux Serums & Vaccins
- (B) RUE: 58 avenue Leclerc
- (C) VILLE: Lyon
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69007
- (G) TELEPHONE: 33 (0) 4 72 73 70 90
- (H) TELECOPIE: 33 (0) 4 72 73 78 50

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Emulsion immunostimulante

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucl,ique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GAGAACGCTC GACCTTCGAT

20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucl,ique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GGGGTCAAGC TTGAGGGGGG

20